



Disp&FLOW® – Grenouille

Test rapide de détection de protéine spécifique

N° cat. : **BIO.049.1**
 Nombre de test : **1**



Test immuno-chromatographique rapide pour la détermination qualitative d'un antigène de grenouille commun présent dans les aliments, les ustensiles de cuisine et les surfaces préparatoires des installations de production ou de transformation de denrées alimentaires.

Le test Disp&FLOW – Grenouille a été conçu pour la détection d'un antigène cible dans deux grands types de spécimens :

1. Les échantillons solides à base de nourriture / produits alimentaires solides / ustensiles de cuisine / surfaces techniques dédiées à la découpe ou transformation de denrées alimentaires.
2. Les échantillons liquides de types : potages ; boissons ; eaux de rinçage des outils de préparation des aliments ou d'ustensiles de cuisine

Principe de fonctionnement

Les amphibiens constituent un groupe d'animaux très abondant (plus de 5 000 espèces) et les grenouilles en représentent environ 85%.

La consommation et la manipulation de produits d'origine amphibienne sont strictement interdites par certaines confessions religieuses. La grenouille est aussi connue pour être potentiellement allergisante.

La présence d'antigènes d'amphibiens dus à une contamination accidentelle dans les aliments (notamment dans des produits carnés), les ustensiles de cuisine et les surfaces préparatoires des installations de production ou de transformation de denrées alimentaires peuvent être considérées comme un signe précurseur d'une mauvaise hygiène. Certaines parties du corps des amphibiens peuvent être porteurs de maladies graves et mettre en danger la sécurité sanitaire.

Disp&FLOW – Grenouille détecte l'un des deux principaux allergènes du tissu musculaire de la grenouille: la parvalbumine (allergène *Ran e 1* et *Ran e 2*). Cette protéine est homologue à celle du poisson, qui est aussi considérée comme la protéine allergisante majeure du poisson.

Le test Disp&FLOW – Grenouille est basé sur le principe de l'immuno-chromatographie rapide (migration à flux latéral ou *lateral flow*). L'antigène cible (parvalbumine) présent dans l'échantillon est absorbé par la bandelette puis est reconnu par des anticorps spécifiques conjugués à des microparticules colorées et libres de se déplacer ; une fois formé, ce complexe migre le long de la bandelette jusqu'à une zone très focalisée où il va rencontrer un autre anticorps spécifique fixé au support. L'accumulation des microparticules forme rapidement une ligne colorée qui indique un résultat positif. La présence d'une seconde ligne témoin garantit le bon fonctionnement du test.

Le test est applicable à la détection qualitative (dépistage) ou à la mesure semi-quantitative (suivi ou études comparatives) de la parvalbumine dans les échantillons d'aliments complexes et de tampons prélevés sur les surfaces.

Spécificité et sensibilité du test

Le test Disp&FLOW – Grenouille met en œuvre une paire d'anticorps monoclonaux spécifiques permettant de détecter un antigène commun à toutes les espèces d'amphibiens testées.

Le test ne détecte PAS les antigènes chez les poissons, les reptiles, la lamproie, les crustacés (crevettes, crevettes, homards, etc.), les mollusques et les têtards (protéine fonctionnelle présente seulement à l'étape de grenouille). Cependant, des faux positifs peuvent se produire avec certains mollusques (par exemple, les conques) qui capturent certains antigènes dérivés d'amphibiens au cours de leur cycle de vie.

Les sensibilités (LOD, limite de détection) et plage de détection (ROD) obtenues du test Disp&FLOW – Grenouille varient considérablement entre les espèces d'amphibiens. Cependant, le test détecte toutes les espèces comestibles testées à ce jour.

	LOD	ROD
Echantillon liquide / homogénats à base d'eau / Echantillon solide	25 ppm*	25 – 50 000 ppm
Test surfacique	100 ng/100 cm ²	/

* LOD déterminée en poids humide de l'homogénat de tissu musculaire de grenouille d'espèce *Pelophylax esculentus*

NOTE : La sensibilité est calculée en prenant en compte la teneur en matière antigénique cible dans le matériau solide extrait (ratio solide / liquide 1:10 wt / vol). La sensibilité du test peut être améliorée en abaissant le rapport solide / liquide, mais cela peut entraîner un liquide épais ne pénétrant plus sur la bandelette.

La sensibilité du test diminue lors du chauffage des aliments (cuisson) et dans un environnement riche en graisse (par exemple en présence d'huile ou de crème).

Si le résultat du test est une ligne faiblement colorée ou difficilement interprétable, BIOTEM recommande de tester de nouveau l'échantillon avec une méthode différente, de type ELISA quantitatif ou PCR.

Ce test Disp&FLOW – Grenouille est conçu pour la détection de traces d'antigène de grenouille. Lors de l'utilisation dans un matériau apparent contenant de la grenouille (grenouille émincée), le test peut montrer un résultat paradoxal négatif en raison d'une surcharge d'antigène (« effet Hook »). Pour résoudre ce problème, diluer l'échantillon 5 à 10 fois avec du tampon d'extraction fourni et répéter le test.

Des données détaillées et actualisées sur les performances des tests (sensibilité, spécificité, variabilité, influence de la matrice et du traitement) du test Disp&FLOW – Grenouille peuvent être demandées sur notre messagerie info@biotem.fr.

Contenu du kit

Le test Disp&FLOW – Grenouille contient les éléments suivants :

- Une bandelette-test emballée dans un sachet aluminium contenant un dessiccant et hermétiquement scellé.
- Un écouvillon de prélèvement d'échantillon (test surface).
- Un tube contenant 3 mL de tampon d'extraction permettant la préparation de l'échantillon et l'étape de migration du test.
- Un tube test sans aucun tampon
- Une pipette de transfert de 250µL
- Une notice d'utilisation.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Spatule de prélèvement, de préférence à usage unique.
- Paire de gants.
- Une balance de précision ou cuillère doseuse digitale (optionnel, référence BIO.044.1)

Conservation et stabilité

- Le kit doit être conservé entre +2 et +30°C en atmosphère sèche et à l'abri de l'exposition du soleil.
- **Les bandelettes ne doivent pas être congelées et se conservent dans leur sachet hermétiquement fermé.**
- Le kit doit être utilisé avant la date de péremption indiquée sur l'emballage.

Précautions

- Les composants du kit sont à usage *in vitro* uniquement.
- Le kit peut être utilisé jusqu'à sa date de péremption s'il a été conservé dans les conditions conseillées.
- Les sachets thermo-scellés contenant les bandelettes doivent être conservés entre +2 et +30°C.
- Toutes les manipulations liées à l'utilisation de ce test doivent être effectuées dans le respect strict des conditions de non-contamination des échantillons ; en particulier, porter des gants pendant la manipulation.
- Les bandelettes doivent être manipulées par leur partie supérieure de couleur. Ne pas toucher directement la partie centrale de la bandelette ni son extrémité absorbante.
- **Les bandelettes doivent être conservées dans leur sachet hermétiquement fermé** (les bandelettes sont très sensibles à l'humidité) – ne pas utiliser une bandelette plus de 10 minutes après l'ouverture du sachet.
- Ne pas utiliser le test si le sachet aluminium a été déchiré.
- Procéder avec précaution lors de l'ouverture de ce sachet (voir procédure d'essai), afin de ne pas couper ou endommager la bandelette.
- Utiliser uniquement le tube contenant le tampon d'extraction fourni dans le kit. Ne jamais utiliser de constituants provenant de kits différents.

- **Veiller à ne pas immerger la bandelette plus profondément que la ligne placée sous les flèches.**

Le test Disp&FLOW – Grenouille ne contient que des éléments à usage unique ; ne pas réutiliser.

Elimination des déchets

- Eliminer tous les consommables utilisés conformément à la réglementation des déchets biomédicaux.
- Chaque utilisateur est responsable de la gestion des déchets qu'il produit et doit s'assurer de l'élimination de ces derniers en fonction de la réglementation applicable.

Préparation des échantillons

Préalablement au test, les échantillons ainsi que les bandelettes doivent être amenés à une température comprise entre +18°C et +35°C ; l'analyse d'échantillons plus froids diminue la sensibilité du test ; l'analyse d'échantillons plus chauds n'est pas possible du fait du risque de dégradation des anticorps présents dans la bandelette. S'assurer que le matériel à tester soit un mélange de tous les ingrédients qui composent le produit alimentaire solide final.

Les échantillons liquides peuvent être testés directement.

La limitation de la détection du test pour les échantillons liquides est fonction de leur viscosité et de leur turbidité (présence de particules). Si l'échantillon est visqueux et ne peut pas atteindre la zone de test, il doit être dilué dans le tampon de dilution / extraction. Dans ce cas, le niveau de sensibilité du test doit être ajusté par le facteur de dilution. Les spécimens troubles doivent être filtrés à travers un filtre textile ou un filtre de papier.

1. A l'aide de la pipette de transfert (250µL), insérer 4 fois le volume (1ml) d'échantillon liquide à tester dans le tube test.
2. A l'aide de la pipette de transfert (250µL), prélever 4 fois le volume (1ml) du tampon de dilution/extraction et l'insérer dans le tube test contenant les 1ml d'échantillon à tester.
3. Sceller hermétiquement le tube test avec le bouchon.
4. Eliminer le tube contenant le reste du tampon de dilution / extraction.
5. Agiter vigoureusement le tube test manuellement ou à l'aide de vortex à vitesse maximale pendant 20–30 secondes.
6. Poser le tube à la verticale sur un support. Si le liquide est trouble, laisser sédimenter le contenu du tube ou centrifuger à faible vitesse dans une centrifugeuse, le surnageant est alors prêt pour les essais.

Pour l'essai des matières solides, nous recommandons la procédure suivante:

1. A l'aide d'outils propres bien aiguisés (de préférence jetables), couper et peser un petit morceau (0.1 à 0.3 g) de la matière à tester et l'introduire dans le tube test.
2. Si un outil de volume précis (pipette) est disponible, calculez le volume de tampon d'extraction de l'échantillon requis comme 10 fois le poids réel (par exemple, si le poids est de 0,23 g, ajoutez 2,3 ml du tampon). Sinon, ne pas ajouter plus de la moitié du volume du tube du tampon d'extraction de l'échantillon. Ajustez la sensibilité du test si le rapport poids / volume est différent de 1:10.
3. Ajouter le volume adéquat de tampon de dilution/extraction dans le tube test
4. Sceller hermétiquement le tube test avec le bouchon.
5. Agiter vigoureusement le tube manuellement ou à l'aide de vortex à vitesse maximale pendant 25–30 secondes.
6. Poser le tube à la verticale sur un support et laisser sédimenter le contenu du tube (environ 2 minutes) ou centrifuger à faible vitesse dans une centrifugeuse, le surnageant est alors prêt pour les essais.

Note : Si le liquide est épais/trouble, il peut ne pas pénétrer sur la bandelette. Pour éviter ceci, laisser reposer l'échantillon dilué pendant plus longtemps (jusqu'à 6 heures). L'extrait peut également être filtré par un matériau textile ou centrifugé. Les différents échantillons peuvent être conservés entre +2 °C et +8 °C pour une période de 24 heures. Pour une conservation prolongée, nous recommandons de congeler le spécimen.

Pour l'essai des matériaux solides, ustensiles ou autres tests de surfaces, nous recommandons la procédure suivante:

1. A l'aide de la pipette de transfert fournie (250µL), ajouter 4 fois le volume (1ml) de tampon de dilution/extraction dans le tube test.
2. Eliminer le tube contenant le reste du tampon de dilution/extraction.
3. Se munir de l'écouvillon fourni et le passer sur la surface de l'objet à analyser (en portant une attention particulière aux points suspects).
4. Effectuer un mouvement croisé, dans un sens puis dans l'autre, puis en diagonale.
5. Remettez l'écouvillon dans le tube test contenant le tampon de dilution/extraction et agitez vigoureusement l'écouvillon dans le tampon de dilution/extraction pendant 15 à 30 secondes.
6. Enlevez tout liquide excessif de l'outil d'écouvillonnage contre la paroi du tube test et retirer l'écouvillon.
7. Sceller hermétiquement le tube test avec le bouchon.
8. Agitez vigoureusement le tube test pendant 15 à 30 secondes ou utilisez le mélangeur à tourbillon.
9. Poser le tube à la verticale sur un support et laisser sédimenter le contenu du tube (environ 2 minutes) ou centrifuger à faible vitesse dans une centrifugeuse, le surnageant est alors prêt pour les essais.

Procédure d'essai

Amener le tampon d'extraction et les échantillons à température ambiante (entre +18 et +25°C).

1. Ouvrir le sachet contenant la bandelette-test en prenant garde de ne pas couper la bandelette.
2. Saisir la bandelette par la partie supérieure de couleur et tremper l'autre extrémité verticalement dans le surnageant du tube test. **Attention :** s'assurer que la bandelette n'est pas immergée trop profondément – voir le schéma ci-contre →
3. Laisser tremper la bandelette pendant 10 à 15 secondes puis la placer sur une surface PROPRE et horizontale ; ne pas toucher ou déplacer la bandelette pendant 5 à 10 minutes, le temps de la migration de l'échantillon.
4. Lire le résultat et l'interpréter conformément aux schémas et instructions ci-dessous.



Interprétation des résultats

Le test est positif si 2 lignes rouges apparaissent clairement dans la zone centrale de la bandelette (ligne test et ligne témoin, voir ci-dessous). Ne pas tenir compte de l'ordre d'apparition des 2 lignes ainsi que des nuances éventuelles d'intensité de la couleur.



Le test est négatif si une seule ligne rouge apparaît (voir ci-dessous) : il s'agit de la ligne témoin qui garantit le bon fonctionnement du test.



Si uniquement la ligne test apparaît (voir ci-dessous), le test ne peut être interprété et aucun résultat n'est validé.



Si aucune ligne n'apparaît (voir ci-dessous), le test ne peut être interprété et aucun résultat n'est validé.



Dans ces deux derniers cas, avant de recommencer avec un autre test Disp&FLOW – Grenouille, il convient de s'assurer que l'ensemble des instructions de préparation, de conservation et de mise en œuvre du test ont bien été respectées, ainsi que la date de péremption.



BIOTEM

Société des Systèmes biologiques – BIOTEM
Parc d'activités Bièvre Dauphine
885, rue Alphonse Gourju
38140 Apprieu
France

tél +33 476 65 10 91
fax +33 476 67 48 86
info@biotem.fr
www.biotem.fr

